

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2001136977  
PUBLICATION DATE : 22-05-01

APPLICATION DATE : 26-01-00  
APPLICATION NUMBER : 2000021797

APPLICANT : SHOWA DENKO KK; ,

INVENTOR : AOKI YASUSHI;

INT.CL. : C12N 15/09 C12N 1/15 C12N 1/19 C12N 1/21 C12N 5/10 C12N 9/78 C12P 7/40  
C12P 13/00 //(C12N 15/09 , C12R 1:01 ), (C12N 9/78 , C12R 1:01 )

TITLE : NITRILASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new nitrilase gene derived from a bacterial strain of genus Rhodococcus, a method for effectively producing the nitrilase using a genetically engineered method, a producing method for carboxylic acids from nitrile compounds using the nitrilase and especially a method for producing cyano-carboxylic acids by selectively converting a specific nitrile group of a polynitrile compound to a carboxylic group.

SOLUTION: A DNA sequence of the gene of the nitrilase derived from the bacterial strain of genus Rhodococcus and having an excellent site-selective hydrolyzing ability to an aromatic polynitrile compound having plural nitrile groups, and the effective method for producing carboxylic acids using the nitrilase are provided.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-136977

(P2001-136977A)

(43) 公開日 平成13年5月22日 (2001.5.22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
1/15		1/19	4 B 0 5 0
1/19		1/21	4 B 0 6 4
1/21		9/78	4 B 0 6 5
5/10		C 1 2 P 7/40	
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 12 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-21797 (P2000-21797)

(22) 出願日 平成12年1月26日 (2000.1.26)

(31) 優先権主張番号 特願平11-248161

(32) 優先日 平成11年9月2日 (1999.9.2)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門1丁目13番9号

(72) 発明者 蒲池 晴美

千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号

昭和電工株式会社総合研究所内

(72) 発明者 青木 裕史

千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号

昭和電工株式会社総合研究所内

(74) 代理人 100094237

弁理士 矢口 平

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 ロドコッカス属細菌由来の新規なニトリラーゼ遺伝子を提供すること。また、遺伝子工学的手法を用いてこのニトリラーゼを効率良く生産する方法を提供すること。更に、このニトリラーゼを用いるニトリル化合物からカルボン酸類の製造法、特にポリニトリル化合物の特定のニトリル基を選択的にカルボキシル基に変換するシアノカルボン酸類の製造法を提供すること。

【解決手段】 複数のニトリル基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつロドコッカス属細菌のニトリラーゼ遺伝子のDNA配列およびこのニトリラーゼを用いた効率的なカルボン酸類の製造法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子。

【請求項2】 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子。

【請求項3】 ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC 39484株である請求項1または2に記載のニトリラーゼ遺伝子。

【請求項4】 請求項1乃至3のいずれかに記載の遺伝子DNAを含むプラスミド。

【請求項5】 請求項4に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

【請求項6】 請求項5に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からニトリラーゼを採取することを特徴とするニトリラーゼの製造法。

【請求項7】 請求項5に記載の形質転換体を用いてニトリル化合物のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

【請求項8】 請求項5に記載の形質転換体を用いてポリニトリル化合物の特定のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするシアノカルボン酸類の製造法。

【請求項9】 ポリニトリル化合物が芳香族ポリニトリル化合物である請求項8に記載のシアノカルボン酸類の製造法。

【請求項10】 芳香族ポリニトリル化合物がフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、シアノカルボン酸類が対応する $\alpha$ -、 $m$ -または $p$ -シアノ安息香酸である請求項9に記載のシアノカルボン酸類の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は芳香族ポリニトリル化合物のニトリル基に対し、特に優れた位置選択性を示すロドコッカス属細菌由来のニトリル分解酵素であるニトリラーゼおよびこれを用いるカルボン酸類、特にシアノカルボン酸類の製造法に関する。シアノカルボン酸類は、医薬合成のための中間体として有用である。

## 【0002】

【従来の技術】 ニトリラーゼはニトリル化合物をカルボン酸に変換する反応を触媒する酵素であり、ニトリル化合物から医薬原料等に有用なカルボン酸を得る手段として有用である。当該酵素を産生する微生物としては、例えば *Fusarium solani* (Biochem. J. 167, 685-692 (1977))、

*Nocardia* sp. (Int. J. Biochem. 17, 677-683 (1985))、*Arthrobacter* sp. (Appl. Environ. Microbiol. 51, 302-306 (1986))、*Rhodococcus rhodochrous* J1 (Eur. J. Biochem. 182, 349-356 (1989))、*Rhodococcus rhodochrous* K-22 (J. Bacteriol. 172, 4807-4815 (1990))、*Rhodococcus rhodochrous* PA-34 (Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 184-190 (1992))、*Rhodococcus* sp. ATCC 39484 (Biotechnol. Appl. Biochem. 15, 283-302 (1992)) 等を挙げることができる。

【0003】 また、これらの微生物からはニトリラーゼあるいはニトリルヒドラーゼやアミダーゼが精製され、さらにはこれらの酵素の遺伝子工学的利用を計るため、その遺伝子が単離され一次構造が決定されているものもある。ニトリラーゼ遺伝子については、例えばロドコッカス属細菌由来の遺伝子が特開平7-99980号公報あるいは特開平9-28382号公報において開示されている。

【0004】 近年、このような微生物がもつニトリル化合物の変換能を応用する試みがなされている。特に付加価値の高い化合物の製造に利用するために、立体選択性や位置選択性に優れた酵素が望まれている。例えば、特開平2-84198号公報には光学活性な $\alpha$ -置換有機酸の製造に用いる微生物について、特開平4-341185号公報には光学活性な2-ヒドロキシカルボン酸の製造に用いる微生物について、EP0433117号には光学活性なケトプロフェンの製造に用いる微生物についてそれぞれ開示されている。

【0005】 このような微生物のうち、ロドコッカスエスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC 39484株は複数のニトリル基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつことが報告されている (US556625)。この選択的なニトリル分解酵素系によって生成されるニトリル基とカルボキシル基を分子内に持つ化合物は医薬製造の合成ブロックとして極めて有効である。しかしながら、本菌のもつニトリラーゼの芳香族ポリニトリル化合物に対する活性は比較的低く、この特性を工業的に利用するためには、反応を触媒する酵素の生産性向上が必須であった。しかし、これらの改変に必要不可欠な本菌のニトリラーゼ遺伝子は明らかにされていなかった。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的はロドコッカス属細菌由来の新規なニトリラーゼ遺伝子を提供す

ることにある。また、本発明の目的は、遺伝子工学的的手法を用いてこのニトリラーゼを効率良く生産する方法を提供することにある。更に、本発明の他の目的はこのニトリラーゼを用いるニトリル化合物からカルボン酸類の製造法、特にポリニトリル化合物の特定のニトリル基を選択的にカルボキシル基に変換するシアノカルボン酸類の製造法を提供することにある。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記(1)～(10)の構成を有する。

(1) 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子。

(2) 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子。

(3) ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC39484株である(1)または(2)に記載のニトリラーゼ遺伝子。

(4) (1)～(3)に記載の遺伝子DNAを含むプラスミド。

(5) (4)に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

【0008】(6) (5)に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からニトリラーゼを採取することを特徴とするニトリラーゼの製造法。

(7) (5)に記載の形質転換体を用いてニトリル化合物のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

(8) (5)に記載の形質転換体を用いてポリニトリル化合物の特定のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするシアノカルボン酸類の製造法。

(9) ポリニトリル化合物が芳香族ポリニトリル化合物である(8)に記載のシアノカルボン酸類の製造法。

(10) 芳香族ポリニトリル化合物がフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、シアノカルボン酸類が対応する $o$ -、 $m$ -または $p$ -シアノ安息香酸である(9)に記載のシアノカルボン酸類の製造法。

#### 【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。ロドコッカス エスピーのニトリラーゼ遺伝子のDNA配列の決定方法について説明する。例えば、ロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC39484株染色体DNAは、例えばSaitoらの方法(Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963))を応用して調製することができる。遺伝子のクローニングに用いる染色体D

10

NAライブラリーは、例えばpUC18などのプラスミドベクターを用いて作製することができる。ニトリラーゼ遺伝子のクローニングは、例えばSaikiらのPolymerase Chain Reaction (PCR) 法(Science 230, 1350 (1985))を用いて行うことができる。この時、使用するPCR用プライマーの一方は、ユニバーサルプライマー(フォワードまたはリバース)とし、他方は酵素N末端配列をコードするDNA配列から、適当な配列を選抜する。これらのプライマーを組み合わせ、染色体DNAライブラリーを鋳型としてアンカーPCRを行うことによって、目的酵素のコード配列断片を得ることができる。このアンカーPCR法で得たニトリラーゼコード配列DNA部分断片を全遺伝子領域スクリーニング用プローブとして使用することにより、ロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC39484株の染色体DNAライブラリーからニトリラーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを得ることができる。ニトリラーゼコード配列断片のDNA配列は、Sangerらによるdideoxy法(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463 (1997))など公知の手法を用いて決定することができる。

【0010】得られた酵素構造遺伝子を用いてニトリラーゼ酵素を生産するためには、酵素構造遺伝子を適当な発現ベクター、例えばpUC18のlacプロモーターの下流に接続するなどして作成することができる。このようにして作成したプラスミドを用いて、例えば大腸菌JM101株(*Escherichia coli* JM101)などの宿主を形質転換する。この形質転換体を培養することにより、該ニトリラーゼが宿主細胞内に着量生産される。このニトリラーゼ酵素は菌体のまま変換反応に使用することもできるが、菌体を破碎して無細胞抽出液として、あるいは精製酵素として使用することもできる。

【0011】本発明の原料として用いるニトリル化合物は、ニトリル基を1個含む脂肪族または芳香族の化合物、あるいは複数のニトリル基を含む脂肪族または芳香族のポリニトリル化合物である。フタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルを原料として用いると対応する高純度の $o$ -、 $m$ -または $p$ -シアノ安息香酸を好ましく取得できる。

【0012】本発明の変換反応は、例えばリン酸緩衝液のごとき希薄水溶液に、原料となる物質と変換活性を有する菌体、無細胞抽出液、あるいは酵素を加え、pH5～10、望ましくは6～8、温度15～45℃、望ましくは30～42℃で行うことができる。

【0013】反応液中に生成した生産物の取得方法は特に限定されないが、例えば、反応液の上清を分離回収した後、生産物の特性に応じて沈殿形成、抽出または蒸留

50

等の方法を用いて、あるいはそれらの方法を組み合わせて取得できる。またカラムクロマトグラフィー等を用いて分離精製することにより高純度の生成物を得ることができる。

#### 【0014】

【実施例】以下実施例にて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0015】実施例1：染色体DNAの調製

Lブロス（ポリペプトン1%、NaCl 0.5%、酵母エキス0.5%、pH7.0）に2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地で一昼夜培養したR. sp. ATCC39484株（白金耳を基本培地（KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/l、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O 0.75 g/l、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l、CaSO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O 10 mg/l、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 5 mg/l、酵母エキス 20 mg/l）にグルコース5 g/l、尿素2 g/lを加えた培地300 mlで30℃、24時間培養した。培養後の菌体を集菌し、5 mMのEDTA溶液100 mlで菌体を洗浄した。この菌体を30 mlの緩衝液（20 mMトリス塩酸緩衝液（pH7.1））に懸濁し、60 mgのリゾチムを加え37℃で2時間インキュベートした。この懸濁液を遠心（5000 rpm, 7分間）して菌体を回収し、1 l. 34 mlのTE Bufferに再懸濁し、10% SDS 0.6 mlを加え、さらに100 μg/mlの濃度となるようにプロテナーゼK（メルク社製）を加え、1時間、55℃でゆるやかに振盪した。この溶液をフェノール抽出、エタノール沈殿することによって染色体DNAを調製した。

\* 30

#### 反応液組成：

R. sp. ATCC39484染色体DNAライブラリー	1 μg
ユニバーサルプライマー	100 pmol
酵素N末端プライマー	100 pmol
dNTP溶液	各1 mM
10x反応バッファー	10 μl
ExTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）	2.5 U
	計50 μl

#### 反応条件：

熱変性	94℃、45秒
アニーリング	37～55℃、60秒
伸長	72℃、60～90秒
サイクル数	24回

このようにして行った反応のうち、特異的に増幅される断片が見られた反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、断片を含む部分のゲルを切り出し、ESAYTRAP ver. 2（宝酒造社製）を用いて精製した。これらのDNA断片について、dideoxy法によりDNA配列を決定し、翻訳されたアミノ酸配列がR. sp. ATCC39484株のニトリラーゼN末端配列と

#### \*【0016】実施例2：染色体ライブラリーの作製

得られた染色体DNA 20 μgに対し制限酵素Sau3A Iを用いて部分消化を行った。即ち、染色体DNAを4 μgずつ5本のチューブにとり、100 μlの反応容量中で、制限酵素Sau3A I（宝酒造社製、4～12 U/μl）を添加し37℃で反応させ、10秒毎にチューブの一本を取り、終濃度20 mMとなるようEDTAを加え反応を停止させた。このようにして調製した染色体DNAの部分消化断片溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、1～2 kbのDNA断片を泳動抽出およびエタノール沈殿にて回収し、30 μlのTE溶液に溶解させた。この試料の9 μlと1 μgのBamH I消化後BAP処理したpUC18（宝酒造社製）とをT4 DNAリガーゼ（宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2）を用いてライゲーションした後、大腸菌JM101株を形質転換した。このライブラリーの増幅ライブラリーを作製するために、大腸菌形質転換体を20コロニーずつアンピシリン50 ppmを含むLブロスに植菌し、一昼夜培養した菌体からアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出した。

#### 【0017】実施例3：アンカーPCR法

クローニングに先立ち、プローブとする酵素遺伝子部分断片を得るため、アンカーPCRを行った。酵素配列に由来する一方のプライマーは、公知の本酵素N末端配列から、適当なTmを持つように配列を選択して作成した。すなわち、5'-gct gcg gtg cag gca-3'（およびその相補鎖）、Tm=52℃PCR法は以下の反応条件でおこなった。

#### 【0018】

一致するものを探索した。その結果、得られた断片中に、ニトリラーゼ287アミノ酸をコードするDNA配列を含む約900 bpの断片が見つかった。

#### 【0019】実施例4：コロニーハイブリダイゼーション

実施例3で得られたニトリラーゼ遺伝子の一部を含むPCR断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法により全遺伝子のクローニングを行った。実施例2の方法に従ってSau3A Iで分解した染色体DNAの部分消化断片溶液を1%のアガロースゲル電気泳動に供し、4～8 kbのDNA断片を泳動抽出およびエタノール沈殿にて回収し、乾燥後30 μlのTE溶液に溶

50

解した。この試料溶液の9  $\mu$ lと、1  $\mu$ lのBamHI消化後BAP処理したpUC18（宝酒造社製、100 ng）とをT4 DNAリガーゼ（宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2）を用いてライゲーションした後、大腸菌JM101株を形質転換し、イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）0.1 mM、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド（X-gal）0.004%、アンピシリン50 ppmを含むLBブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に塗布して37°Cで一昼夜培養した。

【0020】生じた白色コロニーを、アンピシリン50 ppmを含むLBブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に釣菌し、37°Cで一昼夜培養した。十分生育した後、寒天平板培地を約2時間4°Cに置き冷却した。乾いたナイロンメンブレン（アマシャム ファルマシア バイオテック社製、Hybond-N<sup>+</sup>）に上下左右の印を鉛筆で付けた後冷却した平板培地の上に静かに置き、メンブレンが全体に濡れてくるのを待って静かにかつ一気にはがし、平板上のコロニーをメンブレンに移し取った。移し取った菌体が少ない時は、メンブレンをアンピシリン50 ppmを含むLBブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に置き、37°Cで一昼夜培養した。

【0021】菌体を移したメンブレンを3 mlのアルカリ溶液（NaOH 0.5 M）上に浮かせ、菌体を溶解した。溶解した菌体の残査を、5  $\times$  SSCで20分間 $\times$ 2回洗浄して落とした。このメンブレンに対し、Random prime DNA labelling and detection system（アマシャムファルマシア バイオテック社製）を用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション?検出の手順は、同キット添付のマニュアルに従って標準的な条件で行った。約4000コロニーに対して行ったハイブリダイゼーションの結果、2株のポジティブクローンが得られた。

【0022】これらのポジティブクローンからアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出し、プローブ用部分断片にある制限酵素切断サイトの位置と、プラスミドの制限酵素分解パターンとを比較して、挿入断片中の遺伝子の位置と方向を推定した。その結果、2つのクローン株から調整したプラスミドpNL06およびpNL09は、ともに全ニトリラーゼ遺伝子を含んでいることが分かった（図1）。そこでより挿入断片長の長いP09株のプラスミド（pNL09）を用いて、dideoxy法により挿入断片約2.6 kbのDNA配列を決定し\*

pUNLE1

（フォワード）

5'-aac atg gtc gaa tac aca aac-3'

（リバーズ）

\*た。プローブとして用いた部分断片配列と一致する部分を探索したところ、挿入断片端から約300 bp下流からlacプロモーターに対して正方向にニトリラーゼ遺伝子が存在していることが分かった。この方向と位置は、制限酵素の切断サイトから推定した遺伝子の位置と方向に一致していた。このニトリラーゼ遺伝子配列から翻訳されたアミノ酸配列は、既知のいずれのニトリラーゼのアミノ酸配列とも異なる新規なものであった。

【0023】実施例5：ニトリラーゼ活性の測定

ニトリラーゼ活性は20 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）10 mlにテレフタルニトリル（TPN）を基質として1~10質量%を懸濁した反応液に、菌体（湿体質量で1g前後）を加えて30°Cで振とうしながら反応を行い、一定時間毎に反応液中に生成したバラシアノ安息香酸をHPLCで定量することによって測定した。通常、反応液から固形物を遠心分離して除去した後、上清を溶離液で100倍希釈したものをHPLCサンプルとして用いた。バラシアノ安息香酸の定量は、以下の装置・条件で行った。

【0024】装置：ポンプ；DS-2（Shodex）

検出器；SPD-6AV UV-VIS spectrophotometer（Shimadzu）

サンプル導入；Autosampler Model23（SIC）with 20  $\mu$ l sample tube記録；Chromatocoder 12（SIC）

カラム；ODSpak F-411（Shodex），4.6 $\times$ 150mm，40°C

分離条件；AcCN/H<sub>2</sub>O=50:50，0.1%TFA，1ml/min.

活性は乾燥質量1gの菌体が1時間に1 lの反応液中に生成するバラシアノ安息香酸の質量（g/l/h r/g乾燥菌体）で表すことにした。

【0025】実施例6：高発現株の作成

実施例4で得たポジティブクローンP09株をアンピシリン50 ppmを含むLBブロスで培養すると、イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）の存在の如何に関わらず弱いニトリラーゼ活性が確認できた。しかしこの活性はドナーであるロドコッカス属細菌の数十分の一という低いものであった。他方のP06株にはニトリラーゼ活性はまったく認められなかった。

【0026】そこで酵素生産量を増やすため、酵素構造遺伝子部分のみ、および酵素構造遺伝子とその下流領域約1.3 kbを含む2種の断片をPCRで作成し、pUC18のlacプロモーター直後につないだプラスミドpUNLE1およびpUNLE2を作成した。PCR断片作成に用いたプライマーおよび反応条件は以下の通り。

【0027】

9  
5'-cc aag ctt tca gag ggt ggc tgt-3'  
HindIIIサイト  
pUNLE2  
フォワード pUNLE1と同じ  
リバース M13 primer M4

【0028】

## 反応液組成:

プラスミドDNA 0.8~1  $\mu$ g  
プライマー 各100 pmol  
dNTP溶液 各1 mM  
10x反応バッファー 10  $\mu$ l  
ExTaq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製) 2.5 U  
計50  $\mu$ l

## 反応条件:

熱変性 94°C、60秒  
アニーリング 55°C、60秒  
伸長 72°C、120秒  
サイクル数 24回

生成した断片をアガロースゲル電気泳動し、抽出・回収した。断片を制限酵素NcoIとHindIIIで切断し、EcoRI/NcoIリンカーとライゲーション後、EcoRI/HindIIIカットしたpUC18とライゲーションした(図2)。これらのプラスミドで大腸菌JM109株を形質転換し、得られた形質転換体をアンピシリン50 ppmを含むLプロスで一昼夜培養した後、イソプロビル-B-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を0.1 mMになるよう培養液に加えてさ\*

20 \*らに2時間培養した。得られた形質転換体のニトリル変換活性を実施例5に示した方法により測定したところ、いずれのプラスミドで形質転換した形質転換体も、pUNL09形質転換体の約500倍、およびドナーであるロドコッカス属細菌の約80倍のニトリラーゼ活性が確認できた(表1)。

【0029】

【表1】

株	非誘導時の活性	誘導時の活性
R. sp. ATCC39484	-	0.14
pUNL09形質転換体	0.029	0.022
pUNLE1形質転換体	0.51	11.1
pUNLE2形質転換体	0.46	10.6

活性単位: g/l/h r/g乾燥菌体

【0030】実施例7;高活性株を用いたバラシアノ安息香酸の製造

実施例6で得たpUNLE1形質転換体をアンピシリン50 ppmを含むLプロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地で一昼夜培養した菌体一金耳を、アンピシリン100 ppmを含むLプロス100 mlに接種し、37°Cで振とう培養した。この培養液をさらにアンピシリン100 ppmを含むLプロス2 lを張り込んだ5 Lジャーフェーマンターに接種し、37°C、800 rpm、通気1 ml/min.で一昼夜通気攪拌培養した。定常期初期に対数増殖期終期の菌体培養液に、終濃度0.1 mMになるようイソプロビル-B-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、さらに4時間培養を続行した。

【0031】培養液を遠心分離して得た菌体を、20 mMリン酸緩衝液(pH7.0)1 lに再懸濁し、100 gのテレフタルニトリル(TPN)を加え、35°Cで攪

拌しながら反応を行った。反応液の一部を1時間毎に取り、実施例5の方法により反応液中に生じたバラシアノ安息香酸を定量した。バラシアノ安息香酸は形質転換体により速やかに生成され、約3時間で反応液中に3%蓄積した(図3)。反応終了後、反応液に濃塩酸を添加してpHを1とし、バラシアノ安息香酸を沈殿させた。これを濾紙で濾過し、希塩酸(0.1モル/l)で洗浄した後、真空乾燥した。この乾燥標品の純度は99.9%以上であった。不純物として検出されたのは原料テレフタル酸であった。

【0032】

【発明の効果】本発明は複数のニトリル基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつロドコッカス属細菌のニトリラーゼ遺伝子のDNA配列およびこのニトリラーゼ用いた効率的なカルボン酸類の製造法を提供するものである。得られた形質転換体の変換活性は遺伝子ドナーに比して十分に高く、生成物の純度も高いことから有用化合物の工業的生産へ



適用できる。

【0033】

【図面の簡単な説明】

【図1】 コロニーハイブリダイゼーション（実施例4）で得られたポジティブクローンから調整したプラスミドの構造。

\*【図2】 ニトリラーゼ遺伝子発現プラスミドの構築。  
【図3】 テレフタルニトリル→パラシアノ安息香酸変換反応におけるパラシアノ安息香酸の蓄積カーブの比較。

【0034】

\* 【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K.K.

<120> Nucleic acid encoding nitrilase from Rhodococcus sp.  
ATCC 39484 useful for conversion of aromatic  
poly-nitrile compounds to acids.

<130> 11H110389

<150> JP 11-248161

<151> 1999-9-2

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1531

<212> DNA

<213> Rhodococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (324)..(1421)

<400> 1

agcttgacca tgattacgaa ttcgagctcg gtacccgggg atcgaaccag caacggggac 60  
gcacagtcga cgtagacctc gacctatccg ccgttcgca gaaggacacc gaccaccacc 120  
acttcaacat ccttcaacgt qcccggccag tccttcgacg aatcgaacg gcgaagagcc 180  
gcctcggacc ccccggccga accgctcgat gaactccct acacgggtgg cgcagaatgc 240  
caggaccctgt gtcattccac gtcaattcac gcgcctttc acctcgtact gtectgcca 300  
acacaagcaa cggaggtacg gac atg gtc gaa tac aca aac aca ttc aaa gtt 353

Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val

1 5 10

gct gcg gtg cag gca cag cct gtg tgg ttc gac gcg gcc aaa acg gtc 401  
Ala Ala Val Gln Ala Gln Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val

15 20 25

gac aag acc gtg tcc atc atc gcg gaa gca gcc cgg aac ggg tgc gag 449  
Asp Lys Thr Val Ser Ile Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu

30 35 40

ctc gtt gcg ttt ccc gag gta ttc atc ccg ggg tac ccg tac cac atc 497  
Leu Val Ala Phe Pro Glu Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile

45 50 55

tgg gtc gac agc ccg ctc gcc gga atg gcg aag ttc gcc gtg cgc tac 545  
Trp Val Asp Ser Pro Leu Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr

60 65 70

cac gag aat tcc ctg acg atg gac agc ccg cac gta cag cgg ttg ctc 593  
His Glu Asn Ser Leu Thr Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu

75 80 85 90

gat gcc gcc cgc gac cac aac atc gcc gta gtg gtg gga atc agc gag 641

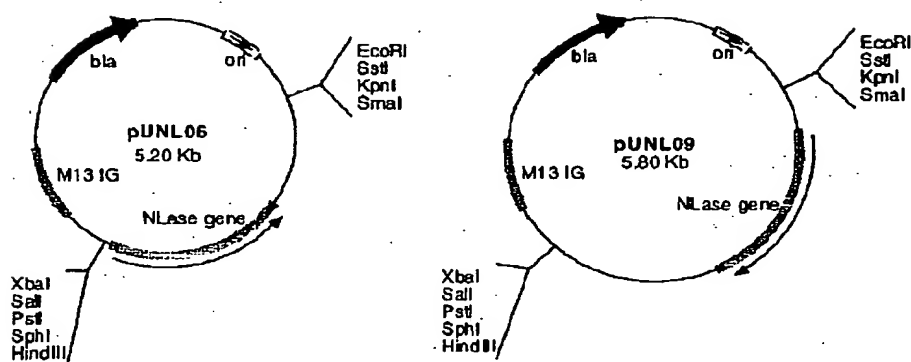
13	14
Asp Ala Ala Arg Asp His Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser Glu	
95 100 105	
cqg gat qgc qgc aqc ttg tac atg acc caq ctc atc atc qac qcc gat	689
Arg Asp Gly Gly Ser Leu Tyr Met Thr Gln Leu Ile Ile Asp Ala Asp	
110 115 120	
ggg caa ctg gtc gcc cga cgc cgc aag ctc aag ccc acc cac gtc gag	737
Gly Gln Leu Val Ala Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu	
125 130 135	
cgt tcg gta tac gga gaa gga aac qgc tcg gat atc tcc gtg tac qac	785
Arg Ser Val Tyr Gly Glu Gly Asn Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp	
140 145 150	
atg cct ttc qca cgg ctt qgc qgc ctc aac tgc tgg gag cat ttc caq	833
Met Pro Phe Ala Arg Leu Gly Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln	
155 160 165 170	
acg ctc acc aag tac qca atg tac tcg atg cac gag caq gtg cac gtc	881
Thr Leu Thr Lys Tyr Ala Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val	
175 180 185	
qcg aqc tgg cct qgc atg tcg ctg tac caq ccg gag gtc ccc qca ttc	929
Ala Ser Trp Pro Gly Met Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe	
190 195 200	
qgt gtc gat gcc caq ctc acg qcc acg cgt atg tac qca ctc gag gga	977
Gly Val Asp Ala Gln Leu Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly	
205 210 215	
caa acc ttc gtg gtc tgc acc acc caq gtg gtc aca ccg gag gcc cac	1025
Gln Thr Phe Val Val Cys Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His	
220 225 230	
gag ttc ttc tgc gag aac gag qaa caq cga atg ttg atc qgc cga qgc	1073
Glu Phe Phe Cys Glu Asn Glu Glu Gln Arg Met Leu Ile Gly Arg Gly	
235 240 245 250	
gga ggt ttc qcg cgc atc atc qgg ccc qac qgc cgc gat ctc qca act	1121
Gly Gly Phe Ala Arg Ile Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr	
255 260 265	
cct ctc gcc gaa gat gag gag ggg atc ctc tac gcc qac atc gat ctg	1169
Pro Leu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu	
270 275 280	
tct qcg atc acc ttg qcg aag caq gcc gct qac ccc gtg qgc cac tac	1217
Ser Ala Ile Thr Leu Ala Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr	
285 290 295	
tca cgg ccg gat gtg ctg tcg ctg aac ttc aac caq cgc cgc acc acg	1265
Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg Arg Thr Thr	
300 305 310	
ccc gtc aac acc cca ctt tcc acc atc cat gcc acg cac acg ttc gtg	1313
Pro Val Asn Thr Pro Leu Ser Thr Ile His Ala Thr His Thr Phe Val	
315 320 325 330	
ccg caq ttc ggg qca ctc qac qgc gtc cgt gag ctc aac gga qcg qac	1361
Pro Gln Phe Gly Ala Leu Asp Gly Val Arg Glu Leu Asn Gly Ala Asp	
335 340 345	
gaa caq cgc qca ttg ccc tcc aca cat tcc qac gag acg qac cgg qcg	1409
Glu Gln Arg Ala Leu Pro Ser Thr His Ser Asp Glu Thr Asp Arg Ala	

15 350 355 360 16  
 aca gcc acc ctc tgactcgggc qcaccctggc cgcctccgaa gcgccacggc 1461  
 Thr Ala Thr Leu  
 365  
 tgtgtgaagg qccgaacacg qggaatcga qgaccccgq qtaccgaqct cqaattcgta 1521  
 atcatggatca 1531  
 <210> 2  
 <211> 366  
 <212> PRT  
 <213> Rhodococcus sp.  
 <400> 2  
 Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val Asp Lys Thr Val Ser Ile  
 20 25 30  
 Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu Leu Val Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45  
 Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile Trp Val Asp Ser Pro Leu  
 50 55 60  
 Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu Asp Ala Ala Arg Asp His  
 85 90 95  
 Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu  
 100 105 110  
 Tyr Met Thr Gln Leu Ile Ile Asp Ala Asp Gly Gln Leu Val Ala Arg  
 115 120 125  
 Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Ser Val Tyr Gly Glu  
 130 135 140  
 Gly Asn Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp Met Pro Phe Ala Arg Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Ala  
 165 170 175  
 Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Gly Met  
 180 185 190  
 Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe Gly Val Asp Ala Gln Leu  
 195 200 205  
 Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly Gln Thr Phe Val Val Cys  
 210 215 220  
 Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His Glu Phe Phe Cys Glu Asn  
 225 230 235 240  
 Glu Glu Gln Arg Met Leu Ile Gly Arg Gly Gly Gly Phe Ala Arg Ile  
 245 250 255  
 Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Glu Asp Glu  
 260 265 270  
 Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala  
 275 280 285  
 Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu  
 290 295 300

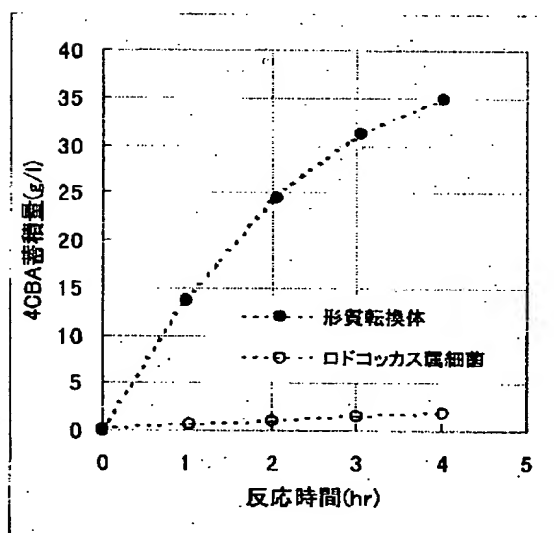
18

10

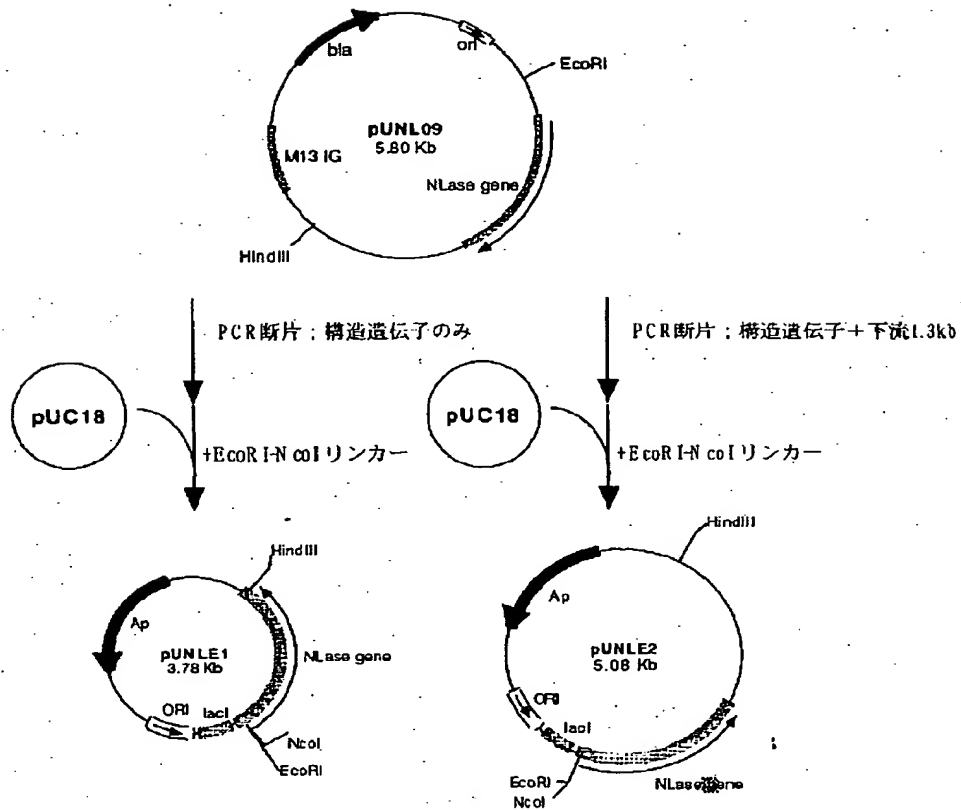
【图 1】



【圖 3】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 9/78

C 1 2 P 13/00

C 1 2 P 7/40

C 1 2 R 1:01)

13/00

(C 1 2 N 9/78

// (C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:01)

C 1 2 R 1:01)

C 1 2 N 15/00

Z N A A

(C 1 2 N 9/78

5/00

A

C 1 2 R 1:01)

C 1 2 R 1:01)

ドターム(参考) 4B024 RA11 BA80 CA04 DA06 EA04  
GA11 HA01  
4B050 CC03 DD02 LL05  
4B064 AE01 CA02 CA19 CA21 CB01  
CC03 CC24 CD12 DA01 DA11  
DA16  
4B065 AA26X AA45Y AC10 BB12  
CA16 CA31 CA44 CA47